

Biocontrole *in vitro* de *Botrytis cinerea* por Leveduras *killer* Visando Aplicação em Morangos Pós-colheita

Biocontrol in vitro of *Botrytis cinerea* by *killer* Yeasts Concerning to Application on Post-harvest of Strawberry

Andriélen Virke de Oliveira

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Francisco Beltrão, PR

andri.utfpr@gmail.com

Paula Regina Rabelo

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Francisco Beltrão, PR

paulla_rb@hotmail.com.br

Ciro da Silva Portes

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Francisco Beltrão, PR

ciroportes@gmail.com

Alexandre Rodrigo Coelho

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Francisco Beltrão, PR

arcoelho@utfpr.edu.br

Resumo: O fungo *Botrytis cinerea* é conhecido por causar a “podridão cinzenta” em morangos. Para evitar possíveis perdas, frutos *in natura* são submetidos à aplicação de fungicidas químicos, elevando o custo de produção e permitindo o surgimento de culturas fúngicas resistentes. Neste cenário, o controle biológico com a utilização de leveduras antagonistas com potencial *killer*, constitui uma alternativa importante, visto que estas não apresentam resíduos tóxicos nos frutos tratados. Com base no pressuposto, avaliou-se o antagonismo *in vitro* de 24 leveduras *killer* positivas, isola-

Recebido em 12/08/2011 - Aceito em 25/11/2011.

RECEN	Guarapuava, Paraná	v. 13	nº 3	p. 353-364	Edição Especial	2011
-------	--------------------	-------	------	------------	-----------------	------

das de morango comercial e orgânico, contra o desenvolvimento de *B. cinerea*, por meio de antifungigrama em meio sólido. Das 24 leveduras *killer* positivas testadas, quinze apresentaram antagonismo por competição de nutrientes e apenas duas apresentaram antagonismo evidenciado por competição de nutrientes e antibiose. Os dados reforçam a possibilidade de aplicação prática de leveduras no controle de doenças em frutas pós-colheita.

Palavras-chave: controle biológico; frutas; fungos filamentosos.

Abstract: *Botrytis cinerea* is known by causing the “gray mould” in strawberries. In order to prevent possible losses, fruits *in natura* are submitted to chemical fungicides, raising the production cost and allowing the resistance in spoilage moulds. However, the biological control using *killer* yeasts constitutes an important alternative, since these microorganisms have been showed no toxic residues in treat fruits. Taking this into account, the antagonism *in vitro* of 24 *killer* yeasts strains isolated from commercial and organic strawberry was evaluated against *B. cinerea*, by diffusion agar method. Fifteen yeasts showed antagonism by nutrient competition, and the antibiosis/nutrient competition was showed by only two yeast strains. The results indicate the possibility of practical application of *killer* yeasts in the biocontrol of post-harvest fruits.

Key words: biological control; fruits; moulds.

1 Introdução

O morangueiro é uma planta frutífera sujeita a doenças fúngicas, que afetam o funcionamento de diversas partes da planta, reduzindo a produtividade e causando prejuízos na comercialização e vida de prateleira dos frutos pós-colheita [1]. Danos econômicos são evidenciados pelos produtores de morango principalmente quando os frutos sofrem o ataque de *Botrytis cinerea*, fungo filamentoso causador da moléstia conhecida como ‘mofo cinzento’ [2].

O controle da doença ainda é feito com aplicação de defensivos agrícolas, o que

promove um alto custo na produção, aliado a possibilidade do surgimento de culturas fúngicas resistentes [1]. Segundo Guimarães [3], o manejo de doenças de plantas por meio do controle biológico é uma alternativa agro-ecológica, contribuindo na substituição do uso de fungicidas químicos tradicionalmente utilizados.

Neste contexto, os agentes microbianos constituem uma alternativa viável e eficaz no controle de fitopatógenos na pós-colheita, buscando atender assim, a demanda cada vez mais exigente dos consumidores por produtos naturais saudáveis [4]. Entre as alternativas propostas para o controle biológico cita-se a utilização de leveduras, micro-organismos não toxigênicos comumente encontrados na superfície de frutos que minimizariam o impacto ambiental em caso de aplicação [5]. Determinadas leveduras, por sua vez, apresentam o fator *killer*, um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo capaz de inibir o crescimento de outros micro-organismos [6], atuando na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando consequentemente o extravasamento de íons potássio e ATP [7]. Leveduras pertencentes à microbiota natural podem constituir agentes biológicos promissores no controle de patógenos fúngicos deteriorantes de frutas [8]. *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, constitui uma alternativa eficiente no controle de *Penicillium expansum* em maçãs, mamões e pêras, promovendo o prolongamento da vida útil durante o transporte e armazenagem das frutas frescas [9].

Estudos promissores realizados por Coelho et al. mostraram efeito inibitório de *Candida guilliermondii* e *Pichia ohmeri* na germinação de esporos e desenvolvimento de hifas de *P. expansum*, ambos associados ao fator *killer* [10, 11].

Com base no pressuposto, este trabalho teve como objetivo estudar o biocontrole de *B. cinerea* empregando leveduras antagonistas positivas quanto ao caráter *killer*.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção das amostras

Quatro amostras de morangos comerciais foram obtidas de mercados da região de Francisco Beltrão - PR e duas amostras de morangos orgânicos foram cedidas por produtor da cidade de Dois Vizinhos - PR.

2.2 Fungo teste

Os micélios fúngicos de *Botrytis cinerea* (deteriorante de frutas) provenientes de cultura monospórica foram utilizados para o teste de antagonismo, quanto a inibição de crescimento [12].

O fungo foi mantido em Ágar Batata Dextrose-BDA inclinado a 4°C na ausência de luz, e o inóculo padronizado com auxílio de câmara de Newbauer (10^5 esporos/mL) para os testes subsequentes.

2.3 Isolamento das leveduras

Para o isolamento das leveduras, 10 g da parte deteriorada da fruta foram diluídos em 90 mL de água peptonada estéril a 0,1%, seguido de diluições decimais seriadas até 10^{-5} . Um volume de 1,0 mL das diluições foi assepticamente pipetado e distribuído em placas de Petri estéreis, seguido de adição de 20 mL de Ágar Batata Dextrose (BDA) pH 3,5 acidificado com ácido tartárico 10%. As leveduras foram isoladas após incubação a 25°C por 5 dias e mantidas em Ágar GYMP inclinado (glucose 2,0%, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaHPO_4 0,2% e ágar 1,8%) a 4°C; para os testes subsequentes, reativou-se em Meio Para Levedura - MPL (glucose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1,0%, NaHPO_4 0,3% e ágar 1,8%) a 25°C/48 horas [5]. As leveduras foram isoladas considerando o tamanho e a pigmentação. Após o isolamento, as leveduras receberam um código de identificação MCn_n ou MOn_n , conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Código das leveduras isoladas das amostras de morango comercial e orgânico

Amostras de morangos	Código dos isolados*
Morango Comercial	MC1 ₃ , MC1 ₆ , MC1 ₇ , MC2 ₁ , MC2 ₂ , MC2 ₃ , MC2 ₄ , MC3 ₁ , MC3 ₂ , MC3 ₃ , MC3 ₄ , MC3 ₅ , MC3 ₆ , MC3 ₇ , MC4 ₁ , MC4 ₂ , MC4 ₄ , MC4 ₅ , MC4 ₆ , MC4 ₇ , MC4 ₈ .
Morango Orgânico	MO1 ₃ , MO1 ₅ , MO2 ₁ .

* MCn_n = morango comercial; número da amostra; número da cultura

MOn_n = morango orgânico; número da amostra; número da cultura

2.4 Determinação de caráter *killer* nas leveduras isoladas

Para a determinação do caráter *killer* nas leveduras isoladas, uma alçada da cepa sensível cultivada em ágar Sabouraud glicose foi suspensa em 3 mL de solução salina a 0,85% e padronizada na Escala nº 1 de McFarland. As culturas sensíveis ($3,0 \times 10^6$ células) foram plaqueadas por profundidade em placas de Petri contendo 20 mL de ágar Sabouraud adicionado de 0,03% de azul de metileno [13]. Após solidificação do ágar, inoculou-se uma alçada de leveduras testes previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud glicose sob forma de pequenos pontos (2,0 mm de diâmetro) na superfície do meio. Após incubação a 20°C por 72 horas, a presença de fator *killer* foi evidenciada pela formação do halo de inibição ao redor das leveduras testes [14]. A cultura padrão de levedura utilizada como controle positivo para a produção da toxina *killer* constitui-se de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-738 e como linhagens padrão sensíveis foram utilizadas *Candida glabrata* NCYC 366 (K1), *C. glabrata* NCYC 388 (K3), *C. albicans* 12A, (K8), *Pichia kluyveri* CAY15 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006.

2.5 Antifungigrama em meio sólido por leveduras antagonistas

No antifungigrama em meio sólido procedeu-se estudo com cultivo de células íntegras de leveduras *killer* positivas [5]. A atividade antifúngica foi analisada por meio da técnica de semeadura por profundidade (placas de Petri contendo 25 mL de ágar MPL inoculado com 10^5 esporos de *Botrytis cinerea*). Após a solidificação do ágar, procedeu-se uma perfuração no centro da placa (diâmetro, 8 mm) e colocou-se 100 µL do cultivo de levedura (caldo MPL a 25°C/48 horas). Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas a 25°C e os diâmetros de inibição medidos após 48 a 120 horas, com auxílio de paquímetro [15].

3 Resultados e discussões

Um total de 24 leveduras foi isolado, sendo 21 de amostras de morango comerciais e 3 de amostras de morango orgânico, de acordo com a tabela 1.

A tabela 2 apresenta a caracterização de leveduras positivas para o fator *killer*, ou seja, que evidenciaram a formação de halo de inibição. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que as 24 leveduras analisadas (100%) apresentaram positividade para o fator *killer*, contra pelo menos uma levedura sensível padrão estudada.

Tabela 2. Caracterização de leveduras positivas para o fator *killer** empregando leveduras sensíveis de referência

Leveduras sensíveis	Leveduras (+) para fator <i>killer</i>
<i>Candida glabrata</i> NCYC 366	MC1 ₃ , MC1 ₆ , MC1 ₇ , MC2 ₁ , MC2 ₂ , MC2 ₃ , MC2 ₄ , MC3 ₁ , MC3 ₂ , MC3 ₃ , MC3 ₆ , MC3 ₇ , MC4 ₁ , MC4 ₂ , MC4 ₄ , MC4 ₅ , MC4 ₆ , MC4 ₇ , MO1 ₃ , MO2 ₁ .
<i>C. glabrata</i> NCYC 388	MC1 ₃ , MC1 ₄ , MC1 ₇ , MC2 ₁ , MC2 ₂ , MC2 ₃ , MC3 ₁ , MC3 ₂ , MC3 ₃ , MC3 ₆ , MC3 ₇ , MC4 ₁ , MC4 ₂ , MC4 ₃ , MC4 ₄ , MC4 ₅ , MC4 ₆ , MC4 ₇ , MC4 ₈ , MO2 ₁ .
<i>C. albicans</i> 12A	MC1 ₃ , MC1 ₆ , MC1 ₇ , MC2 ₂ , MC2 ₄ , MC3 ₂ , MC3 ₃ , MC3 ₆ , MC4 ₁ , MC4 ₄ , MC4 ₆ , MC4 ₇ , MO1 ₅ , MO2 ₁ .
<i>Pichia kluyveri</i> CAY-15	MC1 ₃ , MC1 ₇ , MC2 ₁ , MC2 ₄ , MC3 ₃ , MC4 ₄ , MC4 ₅ , MC4 ₆ , MC4 ₇ .
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC-1006	MC1 ₃ , MC1 ₄ , MC1 ₆ , MC1 ₇ , MC2 ₂ , MC2 ₃ , MC2 ₄ , MC3 ₁ , MC3 ₃ , MC3 ₆ , MC3 ₇ , MC4 ₁ , MC4 ₂ , MC4 ₃ , MC4 ₄ , MC4 ₅ , MC4 ₆ , MC4 ₇ , MC4 ₈ , MO1 ₃ , MO1 ₅ , MO2 ₁ .

*Ensaio em ágar Sabouraud adicionado de 0,03% de azul de metileno [13] com culturas sensíveis ($3,0 \times 10^6$ células) incubadas a 20°C por 72 horas, em duplicata

MC = leveduras isoladas de morango comercial

MO = leveduras isoladas de morango orgânico

A totalidade de cepas positivas para o fator *killer* poderiam estar relacionada com a fonte de isolamento e clima regional, condições que exigiriam maior competitividade entre espécies, favorecendo a indução de produção de substâncias inibidoras como mecanismo de resistência [5].

Os resultados deste estudo foram superiores aos encontrados por Coelho [5], cujo estudo realizado com 44 cepas de leveduras isoladas de diferentes fontes naturais

na região norte do Paraná obteve apenas 13 (29,55%) com resultado positivo para o caráter *killer*.

De acordo com a tabela 2, 22 leveduras apresentaram atividade *killer* contra a cultura sensível padrão *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e 14 contra *C. albicans* 12A. Apenas 9 apresentaram-se positivas contra *P. kluyveri* CAY-15, sendo estas provenientes de morango comercial. As cepas MC3₃ e MC4₇ mostraram maior espectro de ação *killer*, com resultados positivos contra todas as leveduras sensíveis testadas, seguido das cepas MC3₆ e MC4₄, que foram positivas contra quatro linhagens sensíveis padrão e as cepas MC1₆ e MC1₇ contra três linhagens, sendo elas *Candida glabrata* NCYC 366, *C. albicans* 12 A, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1006.

Os resultados mostraram também que 20 leveduras foram *killer* positivas contra *C. glabrata* NCYC 366 e *C. glabrata* NCYC 388, sugerindo que esta similaridade poderia indicar produção de uma mesma substância antagônica [13].

O alto espectro de ação *killer* observado nas leveduras provenientes de amostras de morango comercial sugere maior competitividade e/ou resistência das cepas isoladas, provavelmente em virtude da aplicação de fungicidas químicos nos morangos comerciais [1].

De acordo com a tabela 3, o antifungigrama em meio sólido mostra o resultado do efeito antagônico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, evidenciado pela formação de diâmetro de inibição. Das 24 leveduras *killer* positivas testadas, 22 (91,67%) apresentaram antagonismo, sendo 15 baseado em competição por nutrientes, com diâmetros de inibição variando de 9,00 a 25,75 mm, e somente duas cepas (MC1₆, MC1₇) mostraram atividade antifúngica evidenciado por competição de nutrientes e antibiose, cujos diâmetros de inibição foram 28,88 e 29,50 mm, respectivamente.

O resultado da atividade antifúngica por antibiose pode estar relacionado com a produção de toxinas *killer* pelas leveduras, conforme relatado em estudos realizados por Coelho et al. [10, 11], que obtiveram 58,15 da germinação de esporos de *Penicillium expansum* com sobrenadante do cultivo de 72 horas/25°C de *Candida guilliermondii*, enquanto que *Pichia obmeri* (25°C/48 horas) inibiu o desenvolvimento de hifas do mesmo fungo em 64,37%, ambos associados ao fator *killer*.

Tabela 3. Efeito antagônico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de *Botrytis cinerea*

Levedura/código	Diâmetro de inibição (mm)	
	CN*	CN / A**
MC1 ₁	----	----
MC1 ₃	9,00	----
MC1 ₄	11,76	----
MC1 ₆	----	25,75 / 28,88
MC1 ₇	----	16,00 / 29,50
MC2 ₂	----	----
MC2 ₃	11,50	----
MC2 ₄	11,76	----
MC3 ₁	16,00	----
MC3 ₆	----	----
MC3 ₇	----	----
MC4 ₁	----	----
MC4 ₂	----	----
MC4 ₃	13,50	----
MC4 ₄	11,00	----
MC4 ₅	12,00	----
MC4 ₆	13,00	----
MC4 ₇	9,74	----
MC4 ₈	----	----
MO1 ₃	11,76	----
MO1 ₅	10,76	----
MO2 ₁	12,00	----

*Competição por Nutriente: crescimento da levedura em massa, sobre o meio de cultivo

** Competição por Nutrientes / Antibiose: crescimento da levedura em massa e formação de halo de inibição devido à produção de substâncias extracelulares

---- Sem Inibição: crescimento de *B. cinerea* por toda a superfície do Agar

Santos, Sánchez e Marquina [16], relataram a inibição de *Botrytis cinerea* CYC 20010 por *P. membranifaciens* CYC 1106 utilizando-se tanto células íntegras (zona de inibição de 32 mm), como a toxina *killer* purificada. Em estudo *in vitro* realizado por Machado e Bettiol [17], a concentração de 10⁶ células/mL de *Sporidiobolus pararoseus* inibiu aproximadamente 70% da germinação de *B. cinerea*. *Zygosaccharomyces bailii* também mostrou atividade *killer* significativa perante *Fusarium oxysporum* [18].

A figura 1 apresenta as placas de antifungigrama em meio sólido, mostrando o diâmetro de inibição caracterizado por competição de nutrientes (crescimento da

levedura em massa) e antibiose (produção de substância extracelular, evidenciado por halo de inibição).

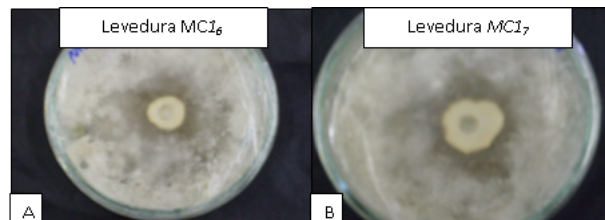


Figura 1. Inibição do desenvolvimento de *Botrytis cinerea* pelas leveduras MC1₆ (A) e MC1₇ (B), evidenciada por competição de nutrientes e antibiose.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a possibilidade da utilização de leveduras *killer* no controle de *B. cinerea*, com redução de resíduos químicos e consequentemente diminuição da toxidade nos frutos tratados. Na indústria fermentativa, por exemplo, leveduras com caráter *killer* inibem cepas de leveduras selvagens deteriorantes, indesejáveis durante o processamento de cerveja [19], vinho [20] e pão [21].

4 Conclusões

As leveduras *killer* mostraram potencial antagonista contra *B. cinerea*, indicando que a descoberta de novas substâncias bioativas naturais é promissora, devendo-se efetuar ensaios adicionais com diferentes leveduras perante *B. cinerea*, visando aplicação prática e segura no controle pós-colheita de morangos.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Araucária e ao CNPq pela concessão de bolsas de Iniciação Científica e apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

6 Referências

- [1] GOUVEA, A. Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

- [2] SANHUEZA, R. M. V.; PIT, B.; SPOLTI, P. Controle de podridões de maçãs e de morangos com *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* no Rio Grande do Sul, XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, Vitória-ES, 2008.
- [3] GUIMARÃES, A. M.; DAL SOGLIO, F. Desenvolvimento participativo de controle biológico da mancha preta dos Citros na Região do Vale do Caí, RS, Brasil. *Rev Bras Agroecologia*, v. 2, n. 2, 2007.
- [4] BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2009.
- [5] COELHO, A. R. Controle de *Penicillium expansum* / biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2005.
- [6] COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. *Semina: Cienc Agrar*, v. 24, n. 2, p. 347-368, 2003.
- [7] MARTINAC, B.; ZHU, H.; KUBALSKI, A.; ZHOU, X.; CULBERTSON, M.; BUSSEY, H.; KUNG, C. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Cell Biol*, v. 87, p. 6228-6232, 1990.
- [8] LEVY, R. M.; SILVA, R. S. F.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Ensaio fatorial da atividade inibitória de *Penicillium* por leveduras em frutos de maçãs. *Braz J Food Technol*, v. 47, n. 3, p. 145-150, 2000.
- [9] BENDO, M. I.; VIECELLI, C. A. Controle biológico de *Rhizopus nigricans* em pós-colheita de morango pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e leite *in natura*. *Rev Faculdade Assis Gurgacz*, v. 2, n. 3, p. 23-35, 2009.
- [10] COELHO, A. R.; CELLI, M. G.; ONO, E. Y. S.; WOSIACKI, G.; HOFFMANN, F. L.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. *Penicillium expansum*

versus antagonist yeasts with perspectives of application in biocontrol and patulin degradation. *Braz Arch Biol Techn*, v. 50, p. 725–733, 2007.

- [11] COELHO, A. R.; LEVY, R. M.; HOFFMANN, F. L.; TANIWAKI, M. H.; KMELMMEIER, C.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Potential bio-control of patulin producing *Penicillium expansum* in post-harvest fruits using antagonistic yeasts. *Mycotoxins and Phycotoxins: advances in determination, toxicology and exposure management*, p. 249-257, 2006.
- [12] NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species-an illustrated manual for identification*. Pennsylvania, Pennsylvania State University Press, p. 193, 1983.
- [13] POLONELLI, L.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microb*, v. 17, n. 5, p. 774–780, 1983.
- [14] MOTOMURA, M.; HIROOKA, E. T. Método rápido para o isolamento de micro-organismos de solo com atividade antifúngica sobre *Fusarium moniliforme*. *Arq Biol e Tecnol*, v. 39, n. 2, p. 313–322, 1996.
- [15] WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. *FEMS Microb*, v. 127, p. 213–222, 1995.
- [16] SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbial Res*, v. 159, p. 331–338, 2004.
- [17] MACHADO, M. A. C. F.; BETTIOL, W. Potencial para o bicontrol de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. *Pesquisa Agro Bras*, v. 45, n. 6, p. 539–545, 2010.
- [18] WEILER, F.; SCHMITT, M. J. Zygotin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res*, v. 3, p. 69–76, 2003.

- [19] YOUNG, T. W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *J Institute Brewing*, v. 87, p. 292–295, 1981.
- [20] BOONE, C.; SDICU, A. M.; WAGNER, J.; DEGRE, R.; SANCHEZ, C.; BUSSEY, H. Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. *Am J Enol Viticul*, v. 41, n. 1, p. 37–42, 1990.
- [21] BORTOL, A.; NUDEL, C.; FRAILE, E.; DE TORRES, R.; GIULIETTI, A.; SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Appl Microb Biotech*, v. 24, n. 5, p. 414–416, 1986.